

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification: C12N 7/02	A1	(11) International Publication Number: WO 00/40702 (43) International Publication Date: 13 July 2000 (13.07.2000)				
(21) International Application Number: PCT/FR99/03315	Published					
(22) International Filing Date: 30 December 1999 (30.12.1999)						
(30) Priority Data: 60/119,948 12 February 1999 (12.02.1999) US 98/16737 31 December 1998 (31.12.1998) FR						
(60) Parent Application or Grant AVENTIS PHARMA S.A. [/]; O. BLANCHE, Francis [/]; O. BARBOT, Anne [/]; O. CAMERON, Béatrice [/]; O. BLANCHE, Francis [/]; O. BARBOT, Anne [/]; O. CAMERON, Béatrice [/]; O. BOUVET, Philippe; O.						
(54) Title: METHOD FOR SEPARATING VIRAL PARTICLES						
(54) Titre: METHODE DE SEPARATION DE PARTICULES VIRALES						
(57) Abstract						
The invention concerns a novel method for purifying and quantifying viral particles. More particularly, the invention concerns a method for purifying and quantifying adenovirus by ion-exchange chromatography. The invention also concerns a method for identifying different adenovirus serotypes.						
(57) Abrégé						
L'invention concerne une nouvelle méthode pour la purification et la quantification de particules virales. Plus particulièrement l'invention concerne une méthode de purification et de quantification d'adénovirus par chromatographie d'échange d'ions. L'invention concerne également une méthode d'identification des différents sérotypes d'adénovirus.						

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 7/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/40702 (43) Date de publication internationale: 13 juillet 2000 (13.07.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/TR99/03315 (22) Date de dépôt international: 30 décembre 1999 (30.12.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/16737 31 décembre 1998 (31.12.98) FR 60/119,948 12 février 1999 (12.02.99) US (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): AVEN- TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20 Avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BLANCHE, Francis [FR/FR]; 41 Rue Des Solitaires, F-75019 Paris (FR). BARBOT, Anne [FR/FR]; 16 résidence le Clos, F-91370 Verrières-le-Buisson (FR). CAMERON, Béatrice [FR/FR]; 6 Rue Tournefort, F-75005 Paris (FR). (74) Mandataire: BOUVET, Philippe; Aventis Pharma, Direction Brevets Tri LEI 144, 20 avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).	(81) Etats désignés: AE, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, MA, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: METHOD FOR SEPARATING VIRAL PARTICLES (54) Titre: METHODE DE SEPARATION DE PARTICULES VIRALES (57) Abstract <p>The invention concerns a novel method for purifying and quantifying viral particles. More particularly, the invention concerns a method for purifying and quantifying adenovirus by ion-exchange chromatography. The invention also concerns a method for identifying different adenovirus serotypes.</p> <p>(57) Abrégé <p>L'invention concerne une nouvelle méthode pour la purification et la quantification de particules virales. Plus particulièrement l'invention concerne une méthode de purification et de quantification d'adénovirus par chromatographie d'échange d'ions. L'invention concerne également une méthode d'identification des différents sérotypes d'adénovirus.</p></p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	JP	Japon	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KZ	Kazakhstan	PT	Portugal		
CN	Chine	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LR	Libéria	SE	Suède		
DK	Danemark			SG	Singapour		
EE	Estonie						

5

1

METHODE DE SEPARATION DE PARTICULES VIRALES

10

L'invention concerne une nouvelle méthode pour la purification et la quantification de particules virales. Plus particulièrement l'invention concerne une méthode de purification et de quantification d'adénovirus par chromatographie d'échange d'ions. L'invention concerne également une méthode d'identification des différents sérotypes d'adénovirus.

15

20

La thérapie génique connaît actuellement un développement remarquable et diverses études cliniques chez l'homme sont en cours depuis les premiers essais conduits en 1990. Parmi les méthodes couramment employées pour le transfert de gènes, les vecteurs viraux s'avèrent particulièrement prometteurs, et parmi ceux-ci, les adénovirus occupent une place de premier plan.

25

Le développement des vecteurs adénovirus en thérapie génique nécessite d'avoir accès à deux types de technologies qui sont aujourd'hui limitantes pour la production des stocks viraux : la première est de disposer d'une méthode rapide, d'une grande sensibilité et très sélective pour la quantification des particules virales dans les échantillons provenant des étapes de construction et d'amplification du virus considéré, ce point est particulièrement important pour l'optimisation du procédé de production des stocks viraux ; la seconde est de disposer d'un procédé de purification fiable, reproductible, simple et facilement extrapolable à l'échelle industrielle pour la purification des particules virales.

30

35

La production de lots cliniques d'adénovirus reste un processus long en raison du nombre d'étapes de transfection et d'amplification dont la productivité n'est pas optimisée. Les adénovirus recombinants sont habituellement produits par introduction de l'ADN viral dans une lignée d'encapsidation, suivie d'une lyse mécanique ou chimique des cellules après environ deux ou trois jours de culture (la cinétique du cycle adénoviral étant de 24 à 36 heures). Selon une autre variante, la culture est poursuivie pendant une durée plus longue (8 à 12 jours), et les virus sont récoltés directement dans le surnageant, après libération spontanée par un phénomène d'autolyse des cellules d'encapsidation (WO98/00524).

40

45

Généralement entre 2 et 7 cycles d'amplifications sont nécessaires pour constituer les stocks viraux. Une limitation importante à l'optimisation du procédé de production des stocks viraux réside dans les méthodes de titration des particules

50

55

5

2

virales. En effet, les méthodes biologiques sont des méthodes relativement sensibles et précises mais particulièrement longues à mettre en oeuvre (environ 4 à 15 jours selon le dosage utilisé i.e. activité du transgène (tdu) ou obtention de plaque (pfu)). Des méthodes analytiques plus rapides ont été développées mais celles-ci ne présentent pas un degré de précision et de sensibilité suffisant lorsque les titrations de particules virales doivent être effectuées, sans purification préalable, dans des lysats, des extraits cellulaires bruts ou des surnageants de culture. C'est la raison pour laquelle les cycles d'amplification successifs sont réalisés avec des multiplicités d'infection (MOI) estimées de manière approximative. Il en résulte que les étapes d'amplification sont peu reproductibles, voire parfois plus longues et/ou plus nombreuses qu'il ne serait nécessaire avec un procédé optimisé. La détermination rapide et précise des titres de solutions d'adénovirus permettrait d'ajuster la multiplicité d'infection de chaque étape de manière à optimiser l'ensemble du procédé de production des stocks d'adénovirus.

15 La méthode de quantification des particules virales doit satisfaire plusieurs conditions. En premier lieu, elle doit être suffisamment sensible pour assurer le dosage de particules virales dans des préparations diluées ou présentant un faible titre (typiquement $< 1 \times 10^6$ particules virales par ml (pv/ml)) sans recourir à une étape d'enrichissement préalable. Le dosage des particules virales doit pouvoir être effectué directement dans des lysats ou des préparations brutes, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer une étape de purification ou un traitement préalable. De plus, cette méthode doit assurer une sélectivité élevée pour s'affranchir des interférences possibles avec les nombreux composés présents dans les lysats ou extraits cellulaires bruts et dont les proportions peuvent varier en fonction des conditions de culture.

25 Une méthode analytique quantitative basée sur la chromatographie d'échange d'anions a été décrite dans la littérature (Huyghe et al., Human Gene Ther. 6:1403-1416, 1995; P. W. Shabram et al., Human Gene Ther. 8:453-465, 1997). Cette méthode, qui présente une limite de détection de l'ordre 1×10^4 pv/ml, est applicable à la titration de préparations virales purifiées. Cependant, la sensibilité de cette méthode décroît dès lors que l'analyse est réalisée sur des lysats ou des extraits cellulaires bruts. La limite de détection est estimée à $2 \text{ à } 5 \times 10^6$ pv/ml dans de tels échantillons et cette méthode ne permet pas de quantifier les particules adénovirales dans les préparations très diluées et non purifiées telles que les lysats de cellules infectées lors des étapes de transfection et d'amplification du virus pour lesquelles le

50

55

titre adénoviral est typiquement de l'ordre de 1×10^8 pv/ml à 1×10^9 pv/ml. De plus cette méthode ne permet pas non plus de quantifier les particules adénovirales à partir de préparations obtenues dans certains milieux de production dépourvus de protéines animales. En effet, de tels milieux contiennent en fin de culture des composés de type, sucres, acides aminés, vitamines, ou rouge de phénol, etc. parmi lesquels certains d'entre eux peuvent interférer avec les particules adénovirales lors de la quantification du virus et qui conduisent à surestimer très largement le titre de la préparation. Enfin, la méthode chromatographique rapportée par Shabram et al. nécessite un pré-traitement de l'échantillon avec une nucléase à large spectre d'activité (Benzonase®) pour éliminer les acides nucléiques qui interfèrent avec la détection et la mesure des particules.

Concernant les méthodes de séparation préparatives des adénovirus, la chromatographie a été utilisée depuis de nombreuses années pour la purification des particules adénovirales [Haruna, J., Yaosi, H., Kono, R. and Watanabe, I. *Virology* (1961) 13, 264-267; Klemperer, H. G. and Pereira, H. G. *Virology* (1959) 9, 536-545; Philipson, L., *Virology* (1960) 10, 459-465]. Plus récemment des méthodes décrivant la purification à large échelle d'adénovirus recombinants ont été décrites (demandes de brevet internationales WO96/27677, WO97/08298, WO98/00524, WO98/22588).

La demande WO98/00524 décrit notamment une méthode de purification mettant en oeuvre la résine échangeuse d'anions fort Source 15Q et qui permet d'obtenir, en une seule étape chromatographique, des préparations d'adénovirus dont la pureté est au moins équivalente à celle obtenue à partir de préparations purifiées par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium. Ce degré de pureté est très élevé et atteint les standards requis pour des études cliniques chez l'homme (WHO Expert Committee on Biological Standardization, Forty-ninth Report, WHO Technical Report Series, WHO Geneva, in press).

Cependant lorsque le titre viral des préparations à purifier est faible (par exemple dans le cas d'un adénovirus présentant une productivité faible, ou lorsque la purification doit être effectuée à partir d'un stock obtenu lors d'une étape d'amplification précoce), ou encore lorsque le milieu de production du virus conduit à la présence de composés co-élus avec l'adénovirus (comme par exemple dans le cas de milieux dépourvus de sérum de veau), les performances limitées des techniques chromatographiques décrites précédemment ne permettent ni de

quantifier, ni de purifier les particules adénovirales en une seule étape à partir d'un tel matériel de départ.

Le problème se pose par conséquent de pouvoir disposer d'une méthode de titration de particules virales à partir de préparations brutes qui soit tout à la fois rapide, sensible et hautement sélective. Le problème se pose également de disposer d'une méthode de purification fiable, reproductible permettant d'obtenir, à partir de ces mêmes préparations brutes, et de préférence en une seule étape, des préparations virales de qualité pharmaceutique.

Il a maintenant été trouvé et c'est que qui fait l'objet de la présente invention, que certains supports de chromatographie présentent de manière surprenante des propriétés tout à fait exceptionnelles pour la séparation des particules virales et en particulier des adénovirus. Ces propriétés permettent la titration et/ou la purification de particules virales à partir de préparations brutes, sans traitement préalable, avec une sensibilité et une sélectivité très élevée. L'utilisation de ces supports fournit en outre et de manière inattendue une méthode d'analyse simple et rapide pour séparer et identifier par chromatographie, des adénovirus de différents sérotypes ou des adénovirus modifiés au niveau de la fibre ou de l'hexon.

La présente invention a pour objet un procédé séparation de particules virales à partir d'un milieu biologique caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape de chromatographie réalisée sur un support comportant une matrice, des groupements échangeurs d'ions, lesdits groupements étant greffés sur ladite matrice au moyen d'un bras flexible.

La matrice peut être choisie parmi l'agarose, le dextran, l'acrylamide, la silice, le poly[styrene-divinylbenzene], seuls ou en mélange. De préférence la matrice est constituée d'agarose, de préférence encore, il s'agit d'agarose réticulé à 6 % environ.

Les supports constitués de billes d'agarose réticulé sur lequel sont greffés des bras flexibles échangeurs d'ions fonctionnalisés ont été développés pour la chromatographie préparative et industrielle de biomolécules. Ces supports ont plus particulièrement été conçus pour l'étape de capture (c'est à dire l'étape initiale du procédé de purification) des biomolécules à partir de mélanges bruts simplement clarifiés, c'est à dire débarrassés de leurs constituants solides en suspension. Leurs

5

5

performances ont été optimisées dans le sens d'une très grande capacité de fixation des solutés sur le support, d'une très faible contre-pression à fort débit linéaire de liquide, d'un faible coût ainsi que d'une très grande résistance chimique aux agents de nettoyage utilisés pour la régénération.

10

De manière avantageuse, le bras flexible est de nature hydrophile et il est constitué d'un polymère d'origine synthétique ou naturelle. Parmi les polymères d'origine synthétique, on peut citer les polymères constitués de monomères d'alcools polyvinyliques, de polyacrylamides, de polyméthacrylamides ou de polyvinyli éthers. A titre de polymère d'origine naturelle, on peut citer notamment des polymères de nature polysaccharidique choisis parmi l'amidon, la cellulose, le dextran et l'agarose. De préférence le degré de polymérisation du bras flexible est d'environ 30 unités monomériques, de préférence encore, le bras flexible est un dextran de poids moléculaire moyen de 5000 Da environ.

15

20

De préférence, le bras flexible est fonctionnalisé par greffage d'un groupement susceptible d'interagir avec une molécule anionique. Le plus généralement, le groupement est constitué d'une amine qui peut être tertiaire ou quaternaire. Dans le cadre de la présente invention, il est particulièrement avantageux d'utiliser un échangeur d'anions fort. Ainsi, on utilise préférentiellement selon l'invention un support de chromatographie tel qu'indiqué ci-dessus, fonctionnalisé par des amines quaternaires.

25

15

30

A titre de support particulièrement préféré pour la mise en oeuvre de l'invention, on peut citer le Q Sepharose® XL (Amersham Pharmacia Biotech). L'utilisation de ce support est mentionnée dans un des exemples de la demande WO98/39467. Des adénovirus purifiés sont modifiés par traitement par du polyéthylèneglycol (PEG). Après réaction, les adénovirus modifiés, les adénovirus non modifiés et le PEG sont séparés par passage sur une colonne de Q Sepharose® XL. Il s'agit donc d'une simple séparation entre des produits de départ et les produits finaux d'une réaction chimique. L'homme du métier ne pouvait supposer que cette colonne puisse être utilisée avec succès pour la séparation d'adénovirus à partir d'un milieu biologique complexe contenant diverses espèces contaminantes (ADN de l'hôte, ARNs, protéines, lipides, lipoprotéines, endotoxines...), tel qu'un lysat de cellules d'encapsulation. Il n'apparaissait pas non plus à la lecture de ce document que le Q Sepharose® XL puisse être utilisé à des fins préparatives car il est connu

35

25

40

45

30

50

55

5

6

que la majorité des supports perdent leur efficacité dès lors que l'on injecte des quantités importantes de produits.

10

D'autres supports échangeurs d'anions forts présentant des caractéristiques similaires de composition de matrice, de distribution de taille de particules, de porosité, de nature chimique du bras flexible, de densité de greffage peuvent être utilisés pour la séparation préparative ou analytique des particules adénovirales. De manière avantageuse, la matrice est constituée d'agarose réticulé à 6 %, elle est greffée avec des bras flexibles constitués de dextran et fonctionnalisés avec des groupements échangeurs d'anions forts. Le support présente une granulométrie comprise de préférence entre 40 et 200 μm environ ; Le terme "environ" se rapportant à la granulométrie signifie que la valeur à prendre en considération se situe dans un écart compris entre ± 20 % par rapport à la valeur exprimée. De préférence, cet écart est compris entre ± 10 % et de préférence encore il est compris entre ± 5 % par rapport à la valeur exprimée.

15

20

25

De manière plus particulièrement préférée, la granulométrie est comprise entre 45 et 165 μm et centrée sur 90 μm .

30

De manière avantageuse également, la matrice présente une dispersion telle que 95 % des particules ont un diamètre compris entre 0.1 et 10 fois le diamètre moyen des particules, et de préférence entre 0.3 et 3 fois le diamètre moyen des particules.

20

35

Le Q Sepharose® XL, utilisé dans les exemples qui suivent, illustre de façon non exhaustive les performances des supports utilisables dans le cadre de l'invention.

40

Le Q Sepharose® XL présente une distribution de taille des billes allant de 45 à 165 μm , centrée sur 90 μm . Ces caractéristiques de taille et de distribution des billes font de ce support un échangeur chromatographique de type préparatif. La théorie ainsi que la pratique chromatographique indiquent qu'un tel support a des performances très modestes pour la séparation de composés présentant des comportements chromatographiques similaires quant à l'interaction d'échange d'ions. De même, un tel support génère des pics chromatographiques larges mal résolus, en particulier en raison de la grande taille et de la distribution très large des billes qui le constituent. Ces caractéristiques chromatographiques attendues sont vérifiées pour les biomolécules en général comme les protéines, qui sont éluées sous forme de larges

25

45

30

50

55

pics mal séparés (voir Data File Pharmacia Biotech N° 18-1123-82). Par contre, et de façon totalement inattendue, les particules d'adénovirus sont éluées de ce type de support sous forme d'un pic extrêmement fin, très symétrique. Par comparaison aux protéines, comme par exemple l'albumine, l'efficacité d'une colonne remplie de Q Sepharose® XL, mesurée par la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT) ou le nombre de plateaux théoriques par unité de longueur de colonne (N/m), est 50 à 100 fois plus élevée pour l'adénovirus (N/m : 35,000) que pour les protéines comme l'albumine sérique bovine (N/m : 600). Voir par exemple figure 1. Ainsi, lorsqu'il est mis en oeuvre dans des conditions chromatographiques optimisées, ce type de gel et notamment le gel Q Sepharose® XL, donne un pic chromatographique pour l'adénovirus d'une finesse inégalée par les supports généralement préconisés pour la séparation des biomolécules. Parmi les supports préconisés pour la séparation des biomolécules on peut citer les supports dont la matrice de base est de type polystyrene divinylbenzene (comme par exemple les résines Source 15Q et Source 30Q, ou les résines de type Poros HQ, Poros DE2, ou Poros D). On peut également citer des supports dont la matrice de base est de type copolymère méthacrylate éthylène glycol comme par exemple les résines Toyopearl DEAE, QAE, et Super Q, ou les résines de type Fractogel TMAE, TMAE HiCap, DMAE, ou DEAE dont les groupements fonctionnels échangeurs d'ions sont situés sur des chaînes polymériques linéaires de type polyacrylamide greffées sur la matrice.

L'efficacité des supports utilisés dans le cadre de la présente invention pour la séparation des particules d'adénovirus conduit à une très grande sensibilité de détection des particules. Ainsi lorsque ces supports sont mis en oeuvre dans des colonnes chromatographiques analytiques, le comportement chromatographique inattendu des particules virales permet de quantifier l'adénovirus avec une limite de détection très inférieure à la limite de détection des méthodes décrites antérieurement. Cette limite de détection est au moins dix fois inférieure ce qui permet d'atteindre une limite de détection de l'ordre de 1×10^3 pv/ml dans des préparations de type lysat cellulaire brut et une limite de détection de l'ordre de 1×10^7 pv/ml pour des préparations virales purifiées.

Ce type de support permet également d'assurer une sélectivité très élevée vis à vis des contaminants présents dans les échantillons à analyser comme par exemple les protéines et les acides nucléiques. Les protéines se présentent sous forme de pics très larges et élués bien avant le pic viral. Les acides nucléiques sont élués de la colonne

5

8

avec une concentration saline très supérieure à la concentration nécessaire à l'élution du virus. Cette caractéristique, très différente de celle obtenue avec la méthode chromatographique précédemment décrite (Huyghe et al., Human Gene Ther. 6:1403-1416, 1995) permet de s'affranchir des interférences de ce type de composés avec le pic viral. Enfin, même lorsque les préparations à analyser contiennent des espèces co-élues avec les particules virales, la forme très spécifique du pic viral permet aisément de l'identifier et de procéder à sa quantification.

Ainsi, les supports utilisés dans le cadre de l'invention permettent d'identifier et de quantifier très facilement et avec une grande précision le pic de l'adénovirus lorsque celui-ci est analysé à partir de préparations contenant une grande quantité de protéines et d'acides nucléiques. L'analyse quantitative des particules ainsi que la purification est également réalisable à partir de préparations obtenues avec des milieux de production virale très variés, ou des milieux dépourvus de constituants d'origine animale, comme par exemple l'albumine, qu'elle soit d'origine bovine, humaine ou d'une autre origine encore (figure 2). Il est également important de constater que la méthode décrite dans la présente invention est applicable à l'analyse des échantillons contenant des acides nucléiques sans traitement préalable avec une nucléase sans affecter ni la sensibilité ni la sélectivité de la méthode.

A cet égard, un autre objet de l'invention concerne l'utilisation de ce type de support et du Q Sepharose® XL en particulier, pour la séparation préparative ou la purification de particules virales, en particulier d'adénovirus, à partir de milieux biologiques. Un tel procédé de séparation peut éventuellement comprendre une étape préalable de chromatographie sur un autre support tel que ceux utilisés dans le procédé objet de la demande WO98/00524, et en particulier la résine Source15Q. Une telle étape préalable peut se révéler avantageuse dans des cas particuliers, par exemple si une quantité de contaminants trop importante est présente dans le milieu biologique.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation de ce type de support et du Q Sepharose® XL en particulier, pour l'analyse quantitative ou la titration de particules virales, en particulier d'adénovirus, à partir de milieux biologiques.

Le milieu biologique à partir duquel est effectué la purification ou la titration du virus peut être un surnageant de cellules d'encapsidation productrices du virus ou un lysat de cellules d'encapsidation, ou une solution prépurifiée dudit virus. Lorsque

55

5

9

10

la séparation préparative ou la purification des particules virales est effectuée à partir d'un surnageant de cellules d'encapsulation productrices ou d'un lysat, il peut être avantageux de réaliser une étape préalable d'ultrafiltration, de préférence cette étape est réalisée par ultrafiltration tangentielle sur membrane ayant un seuil de coupure compris entre 300 et 500 kDa.

5

15

Le procédé de purification selon l'invention permet d'obtenir des préparations virales de qualité élevée en terme de pureté avec des rendements en particules élevés (de l'ordre de 75 à 80 %) en une étape, à partir d'un stock dilué ou/et très riche en contaminants et ce, dans des conditions production entièrement compatibles avec les exigences industrielles et avec la réglementation concernant la production de molécules thérapeutiques.

20

10

25

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de quantification d'adénovirus caractérisé en ce que les particules virales sont séparées par chromatographie sur un support de type Q Sepharose® XL et la quantité d'adénovirus est déterminée par mesure de l'absorbance des fractions de chromatographie. Le procédé de l'invention permet un suivi plus facile et plus précis de la cinétique de production, directement sur des échantillons homogènes de surnageant, sans prétraitement, ce qui permet une meilleure reproductibilité et un meilleur contrôle des procédés de production des stocks de particules virales.

15

30

20

L'invention a également pour objet l'utilisation de support de chromatographie de type Q Sepharose® XL pour l'identification de différents sérotypes d'adénovirus. En effet, et de façon surprenante, il a été observé que ce type de support permet de séparer et d'identifier de manière simple et rapide une grande variété d'adénovirus de différents sérotypes directement à partir d'un échantillon de milieu de production viral par la détermination du temps de rétention et du ratio des absorbances à 260 nm et à 280 nm du pic chromatographique.

35

25

40

45

30

Concernant la mise en oeuvre des supports de chromatographie dans le cadre de la présente invention, la séparation des particules virales à des fins analytiques ou préparatives peut être effectuée en appliquant sur la colonne de chromatographie un gradient d'élution de sel ou encore selon un mode isocratique c'est à dire à concentration saline constante.

50

55

5

10

Pour les méthodes préparatives, le support chromatographique peut être utilisé dans une colonne de chromatographie de type classique ou dans une colonne adaptée aux systèmes de chromatographie haute performance, en mettant en oeuvre par exemple le support Q Sepharose® XL, ou encore dans un système dit à "lit fluidisé" ou expansé, en mettant en oeuvre par exemple le support Streamline® Q XL. La taille de la colonne chromatographique est déterminée en fonction de la quantité de virus présent dans le matériel de départ.

10

5

15

La préparation virale à purifier peut être appliquée sur le support dans un tampon dont la conductivité est telle que le virus ne soit pas retenu sur le support alors que les acides nucléiques sont fixés. De manière avantageuse, la conductivité est ajustée à 45 mS/cm. Ce mode particulier de mise en oeuvre permet alors de séparer par une simple filtration à travers le support Q Sepharose® XL le virus des acides nucléiques provenant de la cellule hôte contaminant la préparation virale.

20

10

25

Les méthodes de dosage et de purification et de caractérisation des différents sérotypes décrites dans la présente invention peuvent s'appliquer à différents types de virus, et d'adénovirus en particulier, qu'il s'agisse de virus sauvage ou de virus recombinants portant un transgène d'intérêt.

15

30

Outre les dispositions qui précèdent, la présente invention comprend également d'autres caractéristiques et avantages qui ressortiront des exemples suivants, donnés à titre illustratif et non limitatif.

20

35

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : profil d'élution d'adénovirus purifié et d'albumine bovine sur Q Sepharose® XL.

40

Figure 2 : profil d'élution sur Q Sepharose® XL d'un surnageant de culture virale obtenue sur un milieu dépourvu de sérum.

25

Figure 3 : profil d'élution sur Q Sepharose® XL d'une préparation d'adénovirus purifié (2×10^{10} pv injectées).

45

Figure 4 : profil d'élution sur Q Sepharose® Fast Flow d'une préparation d'adénovirus purifié (2×10^{10} pv injectées).

50

55

Figure 5 : Comparaison des profils d'élution d'une préparation d'adénovirus purifié sur Q Sepharose® XL et Q Sepharose® Fast Flow.

Figure 6 : profil d'élution sur Q Sepharose® HP d'une préparation d'adénovirus purifié (2×10^{10} pv injectées).

MATERIEL ET METHODES

1 - Adénovirus et production des adénovirus recombinants défectifs pour la réplication.

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 kilobases environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes tardifs. Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 notamment sont nécessaires à la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Le génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genbank M73260). De même des parties, voire la totalité d'autres génomes adénoviraux (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été séquencées.

Pour leur utilisation en thérapie génique, différents vecteurs dérivés des adénovirus ont été préparés, incorporant différents gènes thérapeutiques. Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de manière à le rendre incapable de réplication dans la cellule infectée. Ainsi, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés de la région E1, essentielle à la réplication virale, au niveau de laquelle sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195 ; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). Par ailleurs, pour améliorer les propriétés du vecteur, il a été proposé de créer d'autres délétions ou modifications dans le génome de l'adénovirus. Ainsi, une mutation ponctuelle thermosensible a été introduite dans le mutant ts125, permettant d'inactiver la protéine de 72 kDa de liaison à l'ADN (DBP) (Van der Vliet et al., 1975). D'autres vecteurs comprennent une délétion d'une autre région essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale, la région E4. La région E4 est en effet impliquée dans la régulation de l'expression des gènes tardifs, dans la stabilité des ARN nucléaires tardifs, dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule

5

12

hôte et dans l'efficacité de la répllication de l'ADN viral. Des vecteurs adénoviraux dans lesquels les régions E1 et E4 sont délétées possèdent donc un bruit de fond de transcription et une expression de gènes viraux très réduits. De tels vecteurs ont été décrits pas exemple dans les demandes WO94/28152, WO95/02697, WO96/22378).

10

5 En outre, des vecteurs portant une modification au niveau du gène IVa2 ont également été décrits (WO96/10088).

15

Les adénovirus recombinants décrits dans la littérature sont produits à partir de différents sérotypes d'adénovirus. Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. Plus particulièrement, les adénovirus recombinants peuvent être d'origine humaine ou animale. Concernant les adénovirus d'origine humaine, on peut citer préférentiellement ceux classés dans le groupe C, en particulier les adénovirus de type 2 (Ad2), 5 (Ad5) ; dans le groupe B, les adénovirus de type 7 (Ad7) ; ou dans le groupe A, les adénovirus de type 12 (Ad12). Parmi les différents adénovirus d'origine animale, on peut citer préférentiellement les adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. D'autres adénovirus d'origine animale sont cités notamment dans la demande WO94/26914 incorporée à la présente par référence.

20

25

30

20 Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, l'adénovirus recombinant est un adénovirus humain du groupe C. De manière plus préférentielle, il s'agit d'un adénovirus Ad2 ou Ad5.

35

Plusieurs méthodes ont été décrites pour la génération d'adénovirus recombinants (C. Chartier et al., J. Virol. 70:4805-4810, 1996 ; WO96/25506 ; J. Crouzet et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 94 :1414-1419, 1997 ; T.-C. He et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 95 :2509-2514, 1998). Ces méthodes permettent de construire chez E. coli des plasmides portant le génome adénoviral d'intérêt, ces plasmides sont ensuite digérés par une enzyme de restriction pour exciser le génome adénoviral du plasmide. Le génome adénoviral est alors transfecté dans une lignée d'encapsulation puis amplifié.

40

45

Les adénovirus recombinants sont habituellement produits par introduction de l'ADN viral dans la lignée d'encapsulation, suivie d'une lyse des cellules après environ 2 ou 3 jours (la cinétique du cycle adénoviral étant de 24 à 36 heures), selon

50

55

une autre variante, la culture est poursuivie jusqu'à 8 à 12 jours et les particules virales sont libérées spontanément dans le milieu de culture par autolyse des cellules d'encapsidation.

Les virus utilisés dans le cadre des exemples qui suivent sont des adénovirus contenant le gène marqueur lacZ de *E. coli* (AV₁₀CMV.lacZ). Ces virus sont dérivés du sérotype Ad5 et possèdent la structure suivante :

- Une délétion dans la région E1 recouvrant par exemple les nucleotides 386 (site *Hin*II) à 3446 (site *Sau*3a).
- Une cassette d'expression du gène lacZ, sous contrôle du promoteur CMV, insérée au niveau de ladite délétion.
- Une délétion de la région E3.

La construction de ces virus a été décrite dans la littérature (WO94/25073, WO95/14102, WO96/25506, J. Crouzet et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 94 :1414-1419, 1997). Il est entendu que toute autre construction peut être utilisée dans le procédé selon l'invention, et notamment des virus portant d'autres gènes hétérologues et/ou d'autres délétions (E1/E4 ou E1/E2 par exemple).

Les techniques de transfection des cellules, d'amplification et de titration des adénovirus ont été décrites précédemment (F.L. Graham et al., Molecular Biotechnology 3:207-220, 1995; Crouzet et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 94 :1414-1419, 1997 ; WO96/25506).

La technique de dosage en rdu de l'activité β -galactosidase codée par le gène lacZ contenu dans les virus AV₁₀CMV.lacZ est réalisée comme décrite par P. Yeh et al. (J. Virol. 70:559-565, 1996).

- Production des adénovirus AV₁₀CMV.lacZ

La récolte du virus à partir des cultures de lignées productrices a été faite soit par un procédé classique faisant appel à une série de cycles de congélation-décongélation, soit par lyse chimique en présence de 1% Tween-20, soit en poursuivant la culture jusqu'à l'autolyse selon le procédé décrit dans WO98/00524.

Les milieux de culture peuvent varier selon les lignées transcomplémentantes utilisées ou selon les quantités mises en œuvre. Ces milieux peuvent être le MEM.

DMEM... complétement ou non de sérum de veau et contenant différentes concentrations de sels inorganiques, sucre, acides aminés, vitamines, hépes ou rouge de phénol.

Les cellules transcomplémentantes de la région E1 telles que les cellules 293 ou PER.C6 sont transfectées à 60-80% de confluence en boîte de culture avec un ADN viral obtenu par digestion d'un plasmide portant le génome adénoviral d'intérêt. L'incubation dure de 8 à 15 jours, le moment de récolte est jugé par l'observation au microscope des cellules qui s'arrondissent, deviennent plus réfringentes et adhèrent de plus en plus faiblement au support de culture. Le virus est ensuite libéré du noyau par 3 à 6 cycles de décongélation successifs (éthanol carboglace à -70°C, bain-marie à 37°C). Le virus ainsi obtenu est utilisé pour infecter de nouveau les cellules transcomplémentantes à une Multiplicité d'Infection (MOI) donnée pouvant varier entre 10 et 500 particules virales par cellule, le virus amplifié est obtenu comme précédemment en poursuivant l'incubation de 40 à 72 h.

Selon une autre variante décrite dans la demande WO98/00524, les cellules ne sont pas récoltées 40 à 72 heures post-infection, mais l'incubation est prolongée entre 8 à 12 jours de façon à obtenir une lyse totale des cellules sans avoir besoin de procéder aux cycles de congélation-décongélation. Le virus est alors libéré spontanément dans le surnageant. Le surnageant est ensuite clarifié par filtration sur des filtres profondeur de porosité décroissante (10µm/1.0µm/0.8-0.2µm). Le surnageant clarifié est ensuite concentré par ultrafiltration tangentielle sur membrane spirale Millipore ayant un seuil de coupure de 300 kDa. Le facteur de concentration est de l'ordre de 20 à 100 fois. Selon une autre variante, le surnageant clarifié peut être utilisé tel quel pour la purification des particules adénovirales par chromatographie sur une colonne de Q Sepharose® XL.

- Analyse des préparations d'adénovirus.

Les différentes techniques analytiques utilisées pour déterminer la qualité des préparations virales obtenues (SDS-PAGE, analyse en Western blot, IE-HPLC sur colonne Resource 15Q, etc.) ont été décrites précédemment (WO98/00524).

2 - Méthodes analytiques mettant en oeuvre le support de chromatographie Q Sepharose® XL.

Les conditions opératoires pour la détection, l'identification et la quantification des particules d'adénovirus à partir d'une culture de cellules d'encapsidation infectées sont réalisées comme décrit ci-après.

Une colonne de chromatographie remplie avec environ 1 ml de Q Sepharose® XL (45-165 µm: Amersham-Pharmacia Biotech) est préparée dans une colonne de type HR 5/5 (Amersham-Pharmacia Biotech). Cette colonne est montée sur un système CLHP de type Waters 626 équipé d'un système de détection UV/visible à barrette de diodes 996 opérant dans la plage d'absorbance 200-300 nm. Cette colonne d'échange d'anions est utilisée pour la séparation et la quantification des particules virales.

Avant chaque analyse, la colonne est équilibrée à 30°C dans un tampon 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 à un débit de 1,5 ml/min. L'échantillon à analyser contenant les particules virales est injecté sur la colonne. Pour obtenir une résolution maximale, la quantité de particules injectée doit être inférieure ou égale à 2×10^{11} particules / ml de support. Le volume injecté n'a pas d'influence sensible sur la séparation des espèces, au moins pour un volume injecté inférieur ou égal à 50 µl par ml de gel. Après l'injection, la colonne est rincée avec 5 volumes du même tampon, et les espèces fixées sont éluées avec un gradient linéaire de 0 à 1 M NaCl dans le tampon 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 sur 30 volumes de colonne. En fin de gradient, la colonne est lavée avec 2 volumes de colonne de soude 0,5 N avant rééquilibration en vue de l'analyse suivante.

Une courbe étalon à 260 nm est construite avec une préparation de particules d'adénovirus purifiée soit en gradient de CsCl, soit par chromatographie. Cette préparation étalon a été tirée au préalable en particules par son absorbance à 260 nm dans une solution de SDS à 0,1 % en utilisant le facteur de conversion de 1×10^{10} particules par unité d'absorbance à 260 nm.

Dans ces conditions, l'adénovirus est élué au temps de rétention de 18 min environ et présente un ratio d'absorbance à 260 nm par rapport à 280 nm de $1,30 \pm 0,02$ (voir figure 3). Le logiciel « Suitability » de la station d'acquisition et de traitement du signal chromatographique Millennium Waters détermine après chaque analyse de façon automatique la valeur de N.m (calculée à mi-hauteur) et de l'asymétrie (calculée à 10 % de la hauteur) du pic. La valeur de N.m sur le pic

5

16

adénoviral est typiquement de 35.000 ± 3.000 et le facteur d'asymétrie du pic est de 1.05 ± 0.05 .

10

3 - Méthode préparative pour la purification d'adénovirus par chromatographie d'échange d'anions.

5 L'adénovirus est purifié à partir de cultures de cellules d'encapsulation 293 ou
15 PER.C6 (WO97/00326). Le virus est produit et récolté dans des surnageants après autolyse comme décrit précédemment. Il est ensuite filtré à travers une membrane $0.45 \mu\text{m}$ (HT Tuffryn ou polysulfone) juste avant purification. En l'absence
20 d'indication contraire, le protocole de purification est identique au protocole mis en oeuvre pour la séparation analytique des particules virales décrit ci-dessus, mais avec un gradient d'éluion différent. L'éluion est effectuée avec un gradient de 0.25 à 1 M NaCl sur 30 volumes de colonne. Le volume de la colonne est adapté aux quantités de virus à purifier en considérant une capacité de 1×10^{12} particules par ml de support chromatographique. De même, le débit linéaire des éluants est fixé à 300 cm/h .

25

15 EXEMPLES

Exemple 1 : comparaison des supports de type Q Sepharose® XL avec le support Q Sepharose® Fast Flow.

30

Cet exemple illustre les propriétés spécifiques des supports de type Q Sepharose® XL vis à vis du support Q Sepharose® Fast Flow.

35

20 Les deux supports sont constitués de billes de structure de base identique (agarose réticulé à 6 %), de même répartition granulométrique ($45-165 \mu\text{m}$). Ils diffèrent par la présence de bras flexibles en dextran portant les groupements échangeurs de type Q pour le Q Sepharose® XL, alors que les mêmes groupements de type Q sont fixés directement sur la matrice d'agarose dans le cas du Q
40 Sepharose® FF.

25

Une préparation d'adénovirus purifiée (2×10^{10} pv) est injectée sur une colonne de Q Sepharose® XL (1 ml de support) et éluée avec un gradient de NaCl tel que défini au paragraphe 2 de la Section Matériel et Méthodes. Le profil d'éluion est présenté dans la figure 3. Dans les mêmes conditions, une analyse identique est effectuée sur une colonne similaire remplie de support Q Sepharose® Fast Flow (FF).

45

50

55

Le profil d'élution est présenté dans la figure 4. La comparaison des performances chromatographiques est présentée dans le tableau ci-dessous.

Support	Efficacité (N/m)	Asymétrie
Q Sepharose® XL	30 000	1,0
Q Sepharose® FF	5 000	1,0

Tableau 1 : comparaison des performances chromatographiques avec les supports Q Sepharose® XL et Q Sepharose® FF

Comme le montrent les figures 3 et 4, le temps de rétention du virus est similaire dans les deux cas ($t = 18$ min pour Q Sepharose® XL et $t = 20$ min pour Q Sepharose® FF), mais le support Q Sepharose® XL présente une efficacité très supérieure au support Q Sepharose® FF.

De la même façon, l'analyse d'un extrait cellulaire brut contenant 2×10^9 particules virales d'adénovirus sur les deux supports (figure 5) montre que seul le support Q Sepharose® XL présente un pic de virus identifié et quantifiable. Par contre, les protéines présentes dans la préparation sont séparées avec une efficacité identique pour les deux supports étudiés (figure 5).

Ces résultats indiquent que la présence des bras flexibles portant les groupements échangeurs est un élément essentiel de ce type de support. La présence de ces bras flexibles contribue de manière importante aux performances chromatographiques avantageuses du Q Sepharose® XL pour la séparation des adénovirus.

Exemple 2 : comparaison des supports de type Q Sepharose® XL avec le support Q Sepharose® HP.

Cet exemple illustre les propriétés spécifiques des supports de type Q Sepharose® XL vis à vis du support Q Sepharose® HP.

Les deux supports sont constitués de billes de structure de base identique (agarose réticulé à 6 %). Le support Q Sepharose® XL présente une distribution de taille des billes allant de 45 à 165 μm centrée sur 90 μm . La granulométrie du support

Q Sepharose® HP est de $34 \pm 10 \mu\text{m}$. La granulométrie du support Q Sepharose® HP est plus fine et beaucoup moins dispersée que celle du support Q Sepharose® XL. Le support Q Sepharose® HP devrait donc présenter des performances chromatographiques très supérieures aux performances du Q Sepharose® XL.

Une préparation d'adénovirus purifiée (2×10^{10} pv) est injectée sur une colonne de Q Sepharose® XL (1 ml de support) et éluée avec un gradient de NaCl tel que défini au paragraphe 2 de la Section Matériel et Méthodes. Le profil d'élution est présenté dans la figure 3. Dans les mêmes conditions, une analyse identique est effectuée sur une colonne similaire remplie de support Q Sepharose® HP. Le profil d'élution obtenu avec le support Q Sepharose® HP est présenté dans la figure 6.

Les résultats présentés dans la figure 6 montrent que le support Q Sepharose® HP présente une efficacité (N/m, 15 000) sensiblement inférieure au support Q Sepharose® XL. De plus le pic viral présente une traine sensible sur le support Q Sepharose® HP (asymétrie, 1,6), alors qu'il est rigoureusement symétrique sur le support Q Sepharose® XL.

De façon inattendue, malgré sa granulométrie plus fine et sa répartition granulométrique moins dispersée, le support Q Sepharose® HP n'atteint pas les performances du support Q Sepharose® XL pour la séparation des particules virales. Il présente par contre des performances bien supérieures pour la séparation des protéines, comme il est indiqué par le fournisseur (Amersham-Pharmacia Biotech) et comme il est confirmé dans nos conditions expérimentales avec des expériences de séparation de l'albumine bovine (tableau ci-dessous).

Support	Adénovirus		Albumine
	Efficacité (N/m)	Asymétrie	Efficacité (N/m)
Q Sepharose® XL	30 000	1,0	600
Q Sepharose® HP	15 000	1,6	4 000

Tableau 2 : comparaison des performances chromatographiques avec les supports Q Sepharose® XL et Q Sepharose® HP

Ces résultats confirment que la présence des bras flexibles portant les groupements échangeurs d'anions forts est un élément essentiel dans la performance chromatographique de ce type de support pour la séparation des particules virales. Ces résultats indiquent également qu'un autre paramètre important à prendre en compte dans la définition du choix du support est la granulométrie et en particulier la dispersion de taille.

Exemple 3 : comparaison des supports de type Q Sepharose® XL avec les supports Fractogel® TMAE(S) et Source 15Q.

Cet exemple illustre les propriétés spécifiques des supports de type Q Sepharose® XL vis à vis du support Fractogel® TMAE(S) et du support Source 15Q.

Les trois supports sont constitués de billes de structure et de composition différentes. Le Q Sepharose® XL est constitué d'agarose réticulé à 6%. Le support Fractogel® TMAE est une résine de polyméthacrylate réticulé et le support Source 15Q est constitué de billes de résine de type polystyrene-divinylbenzene. La granulométrie des supports Fractogel® TMAE(S) (20-40 µm) et Source 15Q (15 µm) est très inférieure et bien moins dispersée que celle du support Q Sepharose® XL (45-165 µm). Par ailleurs, les trois supports présentent les groupements échangeurs forts. Ces derniers sont situés sur des bras flexibles fixés sur la matrice dans le cas du Fractogel® TMAE(S) et du Q Sepharose® XL, contrairement au Source 15Q dont les groupements échangeurs sont greffés directement sur la matrice.

Une préparation d'adénovirus purifiée (2×10^{10} pv) est injectée sur une colonne de Q Sepharose® XL (1 ml de support) et éluée avec un gradient de NaCl tel que défini au paragraphe 2 de la Section Matériel et Méthodes. Le profil d'éluion obtenu est présenté dans la figure 3. Dans les mêmes conditions, une analyse identique est effectuée sur une colonne similaire remplie de support Source 15Q et une autre analyse est effectuée sur une colonne remplie de support Fractogel® TMAE(S).

De façon inattendue, malgré sa granulométrie bien plus fine, le support Fractogel® TMAE(S) n'atteint pas les performances du support Q Sepharose® XL pour la séparation des adénovirus. Il présente par contre des performances bien supérieures pour la séparation des protéines. De même, malgré sa granulométrie très fine et sa distribution granulométrique quasi monodispersée, le support Source 15Q

n'atteint pas, lui non plus, les performances du support Q Sepharose® XL pour la séparation des adénovirus.

Support	Efficacité (N/m)	Asymétrie
Source 15Q	20 000	1.2
Q Sepharose® XL	30 000	1.0
Fractogel® TMAE(S)	20 000	1.5

Tableau 3 : comparaison des performances chromatographiques avec les supports Source 15Q, Q Sepharose® XL et Fractogel® TMAE(S).

Ces résultats indiquent que la présence de bras flexibles portant les groupements échangeurs n'est pas seule responsable des performances chromatographiques spécifiques du support Q Sepharose® XL pour la séparation des adénovirus. La composition chimique de ces bras, leur densité de greffage, la nature et la porosité de la matrice sur laquelle sont greffés les bras flexibles sont autant de paramètres qui peuvent influencer sur les performances chromatographiques du support pour la séparation des particules virales.

Exemple 4 : détection et quantification des particules d'adénovirus sauvages de divers sérotypes.

Cet exemple illustre une méthode de détection et d'identification des particules d'adénovirus sauvages de divers sérotypes basée sur l'utilisation du support chromatographique de type Q Sepharose® XL.

Les divers adénovirus sauvages ont été produits par infection de cellules A549 cultivées sur milieu DMEM et récoltés après 3 cycles de congélation-décongélation des cellules. Les préparations ont ensuite été filtrées à travers une membrane Acrodisc (de type HT Tuffryn 0.45 µm; GelmanSciences) avant analyse.

Les diverses préparations sont ensuite analysées par chromatographie selon le protocole décrit dans le paragraphe 2 de la section Matériel et Méthodes. Cependant, dans l'exemple présenté, les analyses ont été effectuées avec une colonne ayant un volume légèrement supérieur à 1 ml (\approx 1,35 ml), ce qui explique que le temps de

rétenion de l'adénovirus 5 soit supérieur (25,3 min) au temps de rétenion de référence (18 min) indiqué dans la section Matériel et Méthodes.

ADENOVIRUS (SÉROTYPE)	SOUS- GROUPE	TITRE (pv/ml)	Ratio (260/280)	T _r (min)
18		$2,3 \times 10^9$	1,18	15,0
3	B	$4,8 \times 10^{10}$	1,35	20,1
7		$4,4 \times 10^{10}$	1,33	18,3
11		$3,8 \times 10^{10}$	1,30	22,7
14		$1,1 \times 10^{10}$	1,31	27,0
21		$2,7 \times 10^{10}$	1,36	22,8
34		$4,7 \times 10^{10}$	1,30	21,5
1	C	$1,2 \times 10^{10}$	1,32	26,9
2		$2,3 \times 10^{10}$	1,33	26,9
5		$6,6 \times 10^{10}$	1,33	25,3
6		$6,6 \times 10^{10}$	1,38	22,3
13	D	$4,6 \times 10^{10}$	1,55	17,0
20		$8,5 \times 10^{10}$	1,32	22,1
4	E	$3,9 \times 10^{10}$	1,31	20,1
36		$2,9 \times 10^{10}$	1,37	22,4

Tableau 4 : caractérisation chromatographique de divers adénovirus sauvages

Cet exemple montre que les divers adénovirus ont non seulement un temps de rétenion variable suivant les sérotypes considérés mais aussi un ratio d'absorbance 260 nm/280 nm caractéristique du sérotype en question. La combinaison de ces deux critères qui peuvent être mesurés simultanément durant une seule et même analyse chromatographique constitue donc un moyen d'identification rapide et fiable du sérotype de l'adénovirus présent dans la préparation chromatographiée.

Une corrélation a été recherchée entre le temps de rétenion du virus sur la colonne et les caractéristiques de la fibre et de l'hexon des adénovirus de type 7, 3, 4, 5 et 2, pour lesquels les séquences sont publiées (1998 J. Virol. (1998) 72 p. 7909 et Arch. Virol (1997) 142 p. 1307). Aucune corrélation n'est mise en évidence à partir des données d'identité de séquences de la tête de la fibre, ni même à partir des

différences du nombre de répétitions de feuillets β dans la tige de la fibre (voir tableau ci-dessous). Par contre, et de façon surprenante, une corrélation a été mise en évidence entre le temps de rétention du virus et l'identité de séquences de l'hexon (voir tableau ci-dessous). Cette corrélation est en parfait accord avec la charge globale de l'hexon à pH 7 : cette corrélation montre que l'élévation de la charge de l'hexon à pH 7 correspond à une augmentation de la rétention du virus sur la colonne. Des nuances peuvent exister en fonction de la charge à pH 7 de la partie 1.1 exposée de l'hexon, tel qu'indiqué par les données obtenues avec le virus de type 3.

Adénovirus sérotype	Sous Groupe	T _r (min)	Fibre		Nombre répétition tige	Hexon			
			% identité tête	charge à pH7		% identité hexon	pl	Hexon charge à pH7	L.I de Hexon charge à pH7
7	B	18,3	100		6	100	5,31	-16,83	-12,03
3	B	20,1	52	-3,91	6	93,9	5,23	-18,66	-10,03
4	E	20,1	32		12	73,9	5,30	-17,55	-12,06
5	C	25,3	27	-3,61	22	67,8	5,15	-22,57	-20,94
2	C	26,9	33	-2,80	22	67,3	4,96	-26,73	-20,02

Tableau 5 : corrélation entre le temps de rétention du virus et l'identité de séquences de l'hexon.

Exemple 5 : détection et quantification des particules d'adénovirus recombinants au cours des étapes de production d'un stock viral.

Cet exemple illustre l'utilisation des supports de type Q Sepharose® XL pour la détection et la quantification des particules d'adénovirus recombinant AV₁₀CMV.lacZ produites lors des étapes de transfection et d'amplification avec différentes lignées cellulaires d'encapsulation (cellules 293 ou PER.C6).

Cette méthode d'analyse extrêmement rapide fournit en quelques minutes, et à partir d'un surnageant de culture, le titre de la solution d'adénovirus résultant de chaque étape. Cette méthode rapide et sensible permet d'optimiser les conditions d'amplification de l'étape suivante qui peut dès lors être réalisée dans des conditions de MOI déterminée et contrôlée.

Cette méthode d'analyse a été testée pour contrôler la production d'adénovirus recombinants de type AV₁₀CMV.lacZ lors des étapes de transfection et d'amplification sur cellules 293 ou PER.C6.

L'adénovirus AV₁₀CMV.lacZ a été produit après transfection de cellules 293 ou PER.C6 avec le plasmide pXL2822 digéré par PacI (Crouzet et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 94 :1414-1419, 1997) puis infection de cellules respectivement 293 ou PER.C6 à une multiplicité d'infection (MOI) déterminée. La transfection initiale est réalisée avec 5 à 10 microgrammes d'ADN viral obtenu par digestion du plasmide.

Lors de la lyse des cellules, le virus a été récolté par 3 cycles de congélation-décongélation des cellules. Les préparations ont ensuite été filtrées à travers une membrane Acrodisc (de type HT Tuffryn) de 0.45 µm avant analyse.

Les diverses préparations sont ensuite analysées par chromatographie selon le protocole décrit dans le paragraphe 2 de la section Matériel et Méthodes. Le titre de la solution d'adénovirus est déterminé par référence une courbe étalon réalisée dans les conditions décrites au paragraphe 2 de la Section Matériel et Méthodes.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Cellules	Virus	Etape	Titre (pv/ml)	Quantité totale (pv)
293	AV ₁₀ CMV.lacZ	transfection	$3,8 \times 10^8$	$7,6 \times 10^9$
		amplification I MOI 50	$3,5 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^{12}$
		amplification II MOI 30	$4,2 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{13}$
PER.C6	AV ₁₀ CMV.lacZ	transfection	$2,4 \times 10^8$	$9,6 \times 10^9$
		amplification I MOI 30	$2,1 \times 10^{10}$	$6,3 \times 10^{11}$
		amplification II MOI 60	$3,2 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{13}$

Tableau 6 : détection et quantification des particules d'adénovirus recombinant AV_{1,0}CMV.lacZ obtenues lors de la production de stocks viraux dans deux lignées transcomplémentantes (293 ou PER.C6).

Les particules virales totales obtenues ont été dosées pour déterminer la concentration en particules infectieuses (pfu) et particules possédant l'activité du transgène (tdu). Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution d'adénovirus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Ces dosages reposent sur des méthodes biologiques et les valeurs obtenues peuvent apparaître différentes selon les conditions utilisées (J. Virol. (1996) 70 p. 7498). En fait, la formation d'une plage dans une lignée transcomplémentante ne décrit pas nécessairement l'infectivité du virus dans d'autres cellules cibles (Biotechniques (1997) 22 p. 447). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous et les valeurs obtenues sont en parfait accord avec les données de la littérature (P. Yeh et al. J. Virol. (1996) 70 p. 559). En effet, P. Yeh et al. décrivent des virus AdRSV8Gal purifiés par gradient de chlorure de césium ayant des rapport tdu/pfu de 0,49 à 0,68 ce qui est très proche des résultats obtenus ci-dessous.

Cellules	Virus	Titre (pv/ml)	Titre (pfu/ml)	pv/pfu	Titre (tdu/ml)	pv/tdu	tdu/pfu
293	AV _{1,0} CMV.lacZ	$4,2 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^9$	24	$7,6 \times 10^8$	55	0,45
PER.C6	AV _{1,0} CMV.lacZ	$3,2 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^9$	26	$7,4 \times 10^8$	43	0,57

Tableau 7 : relation entre la concentration en particules infectieuses (pfu) et particules possédant l'activité du transgène (tdu).

Exemple 6 : détection et quantification des particules d'adénovirus recombinant produites lors des étapes de transfection et d'amplification sur cellule IGRP2.

Cet exemple illustre l'utilisation des supports de type Q Sepharose® XL pour la détection et la quantification des particules d'adénovirus recombinant

AV_{3,0}CMV.lacZ produites lors des étapes de transfection et d'amplification sur cellule IGRP2.

L'adénovirus AV_{3,0}CMV.lacZ a été produit après transfection de cellules d'encapsulation IGRP2 avec le plasmide pXL3005 digéré par PacI (le plasmide pXL3005 dérive du plasmide pXL2811 décrit dans (Crouzet et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 94 :1414-1419, 1997) par échange du promoteur RSV par le promoteur CMV) puis infection de cellules IGRP2 (WO96/22378) à une multiplicité d'infection (MOI) déterminée. Lors de la lyse des cellules, le virus a été récolté par 3 cycles de congélation-décongélation des cellules. Les préparations ont ensuite été filtrées à travers une membrane Acrodisc (de type HT Tuffryn) de 0.45 µm avant analyse.

Les diverses préparations sont ensuite analysées par chromatographie selon le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Virus	Etape	Titre (pv/ml)	Quantité totale (pv)
AV _{3,0} CMV.lacZ	transfection	0.1×10^{10}	2.0×10^{10}
	amplification I. MOI 100	1.54×10^{10}	1.4×10^{12}
	amplification II. MOI 50	1.39×10^{10}	1.0×10^{12}

Tableau 8 : détection et quantification des particules d'adénovirus recombinant AV_{3,0}CMV.lacZ obtenues lors de la production de stocks viraux.

Les particules virales totales obtenues ont été dosées pour déterminer la concentration en particules possédant l'activité du transgène (3.2×10^5 tdu/ml). Un rapport pv/tdu de 43 est comparable au rapport pv/tdu de 43 et 55 obtenu dans l'exemple 5 et permet de corréliser la mesure physique 1.39×10^{10} pv/ml de particules virales à la mesure biologique de 3.2×10^4 tdu/ml d'unités de transduction.

Exemple 7 : purification du virus par chromatographie sur résine Q Sepharose® XL.

Le matériel de départ est constitué soit du lysat de culture obtenu par congélation-décongélation des cellules d'encapsulation productrices du virus, soit du surnageant obtenu après lyse spontanée des cellules.

Dans l'expérience rapportée dans cet exemple, 153 ml d'un autolysat de culture de cellules PER.C6 infectées par le virus AV₁₉CMV.LacZ contenant 4.9×10^{12} particules ont été injectés sur une colonne de 5,8 ml de Q Sepharose® XL. L'équilibration de la colonne et l'élution du virus ont été effectuées à un débit de 300 cm/h avec un gradient de 0.25 à 1 M NaCl sur 30 volumes de colonne comme décrit pour la séparation analytique du virus dans le paragraphe 2 de la section Matériel et Méthodes. Le pic viral (7,1 ml) a été collecté puis analysé par diverses techniques (EI-CLHP, SDS-PAGE) comme décrit ci-dessous. La fraction collectée est analysée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) sur une colonne de Ressource Q (1 ml) dans un système chromatographique suivant : 10 µl de la fraction purifiée par chromatographie comme décrit ci-dessus sont injectés sur une colonne Ressource Q15 (1ml de gel; Pharmacia) équilibrée dans du tampon Tris/HCl 100 mM pH 8,0 contenant 0,5 mM MgCl₂, (tampon B). Après rinçage avec 5 ml de tampon B, les espèces adsorbées sont éluées avec un gradient linéaire de 30 ml de NaCl (0 à 1 M) dans le tampon B à un débit de 1 ml/min. Les espèces éluées sont détectées à 260 nm. Après l'étape de purification sur colonne de Q Sepharose® XL, la fraction collectée présente une pureté $\geq 99\%$ en particules virales (détection UV à 260 nm). Le rendement de purification en particules virales est de 82 %.

Cette analyse par CLHP montre de plus que l'albumine sérique bovine résiduelle présente dans le lysat de départ est totalement éliminée au cours de la chromatographie préparative.

L'analyse en électrophorèse de la fraction adénovirale purifiée par chromatographie est effectuée en gel de polyacrylamide (4-20 %) en conditions dénaturantes (SDS). Les bandes de protéines sont ensuite révélées au nitrate d'argent. Cette analyse montre que la préparation adénovirale obtenue par chromatographie a un niveau de pureté au moins égal à celui de la préparation obtenue classiquement par ultracentrifugation et qu'elle ne présente pas de bande de protéines supplémentaire

qui indiquerait une contamination de la préparation par des protéines non adénovirales.

La préparation adénovirale obtenue par chromatographie présente un ratio d'absorbance $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ égal à 1.30 ± 0.05 . Cette valeur, qui est identique à celle obtenue pour les meilleures préparations obtenues par ultracentrifugation, indique que la préparation est dépourvue de protéines contaminantes ou d'acides nucléiques contaminants.

La titration du virus montre bien la présence de particules virales infectieuses avec un rapport pv/pfu très satisfaisant. (voir tableau ci-dessous) et les particules virales purifiées ont effectivement l'activité infectieuse attendue.

Etape	Titre (pv/ml)	Titre (pfu/ml)	pv/pfu	Rendement cumulé en pv (%)
avant purification	$3,2 \times 10^{10}$	$0,13 \times 10^{10}$	25	-
fraction chromatographique	56×10^{10}	$1,6 \times 10^{10}$	34	81
produit formulé	93×10^{10}	$3,7 \times 10^{10}$	25	74

Tableau 9 : purification d'adénovirus AV₁₀CMV.LacZ sur support Q Sepharose® XL.

Le procédé décrit dans cet exemple permet donc de purifier les particules adénovirales sans affecter leur pouvoir infectieux, directement à partir d'un lysat de cellules d'encapsulation, sans traitement préalable (ultrafiltration par exemple ou traitement avec une nucléase) du matériel à purifier.

5

28

REVENDICATIONS

10

1. Procédé de séparation de particules virales à partir d'un milieu biologique caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape de chromatographie réalisée sur un support comportant une matrice, des groupements échangeurs d'ions, lesdits

5 groupements étant greffés sur ladite matrice au moyen d'un bras flexible.

15

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la matrice est choisie parmi l'agarose, le dextran, l'acrylamide, la silice, le poly(styrene-divinylbenzene), seuls ou en mélange.

20

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la matrice est constituée d'agarose réticulé et de préférence d'agarose réticulé à 6 %.

25

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la matrice présente une granulométrie comprise entre 40 et 200 μm environ.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la matrice présente une granulométrie comprise entre 45 et 165 μm et centrée sur 90 μm .

30

6. Procédé selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que la matrice présente une dispersion telle que 95 % des particules ont un diamètre compris entre 0,1 et 10 fois le diamètre moyen des particules, et de préférence entre 0,3 et 3 fois le diamètre moyen des particules.

35

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le bras flexible est un bras hydrophile constitué d'un polymère d'origine synthétique ou naturelle.

40

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le bras flexible est un polymère d'origine synthétique choisi parmi les alcools polyvinyliques, les polyacrylamides, les polyméthacrylamides ou les polyvinyl éthers.

45

9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le bras flexible est un polymère d'origine naturelle de nature polysaccharidique choisi parmi l'amidon, la cellulose, le dextran et l'agarose.

50

10. Procédé selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que le degré de polymérisation du bras flexible est d'environ 30 unités monomériques

55

5

29

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le bras flexible est un dextran de poids moléculaire moyen de 5000 Da environ.

10

12. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le groupement échangeur d'ions est un groupement échangeur d'anions fort.

15

5 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le groupement échangeur d'anions fort est une amine quaternaire.

14. Procédé selon l'une des revendications 7 à 13 ou selon la revendication 5, caractérisé en ce que la chromatographie est effectuée sur un support de type Q Sepharose® XL.

20

10 15. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le milieu biologique est un surnageant de cellules d'encapsidation productrices dudit virus.

25

16. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le milieu biologique est un lysat de cellules d'encapsidation productrices dudit virus.

17. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le milieu biologique est une solution prépurifiée dudit virus.

30

18. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une étape préalable d'ultrafiltration.

35

19. Procédé selon la revendication 18 caractérisé en ce que l'ultrafiltration est une ultrafiltration tangentielle sur membrane ayant un seuil de coupure compris entre 300 et 500 kDa.

20

20. Utilisation de support de chromatographie de type Q Sepharose® XL pour la séparation analytique et/ou préparative de particules virales.

40

21. Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que les particules virales sont des adénovirus.

45

25 22. Utilisation de support de chromatographie de type Q Sepharose® XL pour l'identification de différents sérotypes d'adénovirus.

50

55

5

30

23. Utilisation de support de chromatographie de type Q Sepharose® XL pour la titration d'adénovirus.

10

24. Procédé de quantification d'adénovirus caractérisé en ce que les particules virales sont séparées par chromatographie sur un support de type Q Sepharose® XL et la quantité d'adénovirus est mesurée par absorbance des fractions de chromatographie.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

1/6

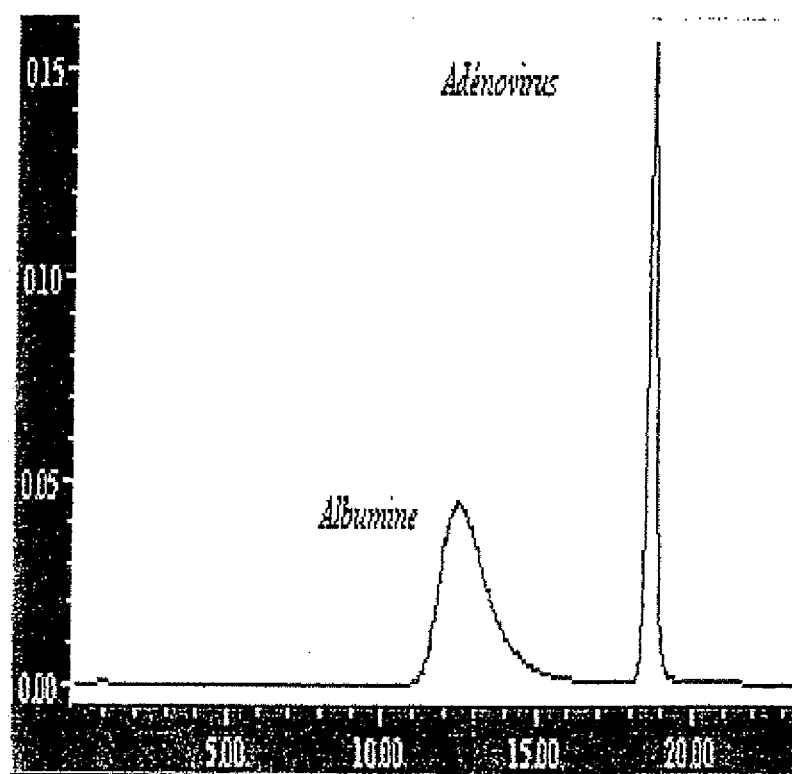


Figure 1

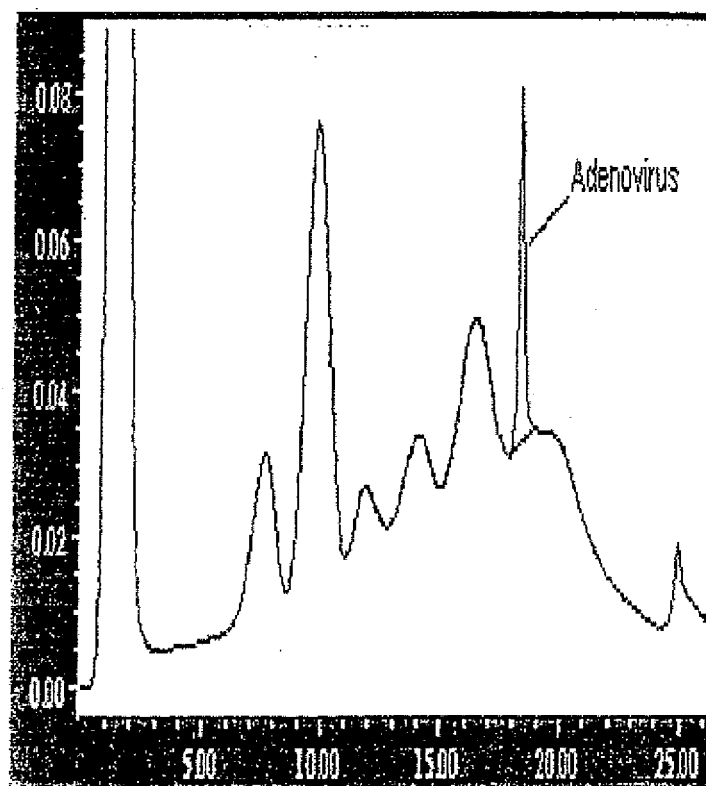


Figure 2

3/6

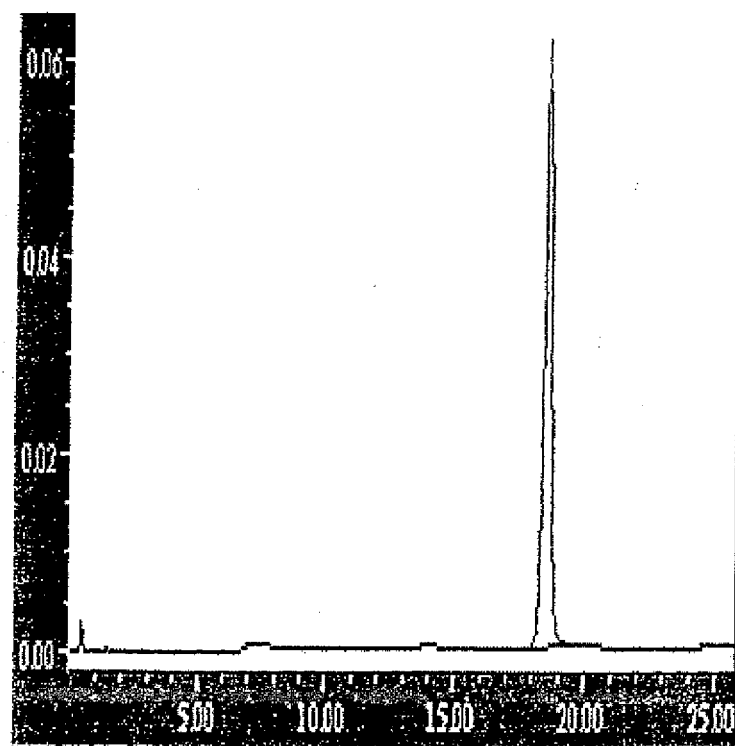


Figure 3

4/6

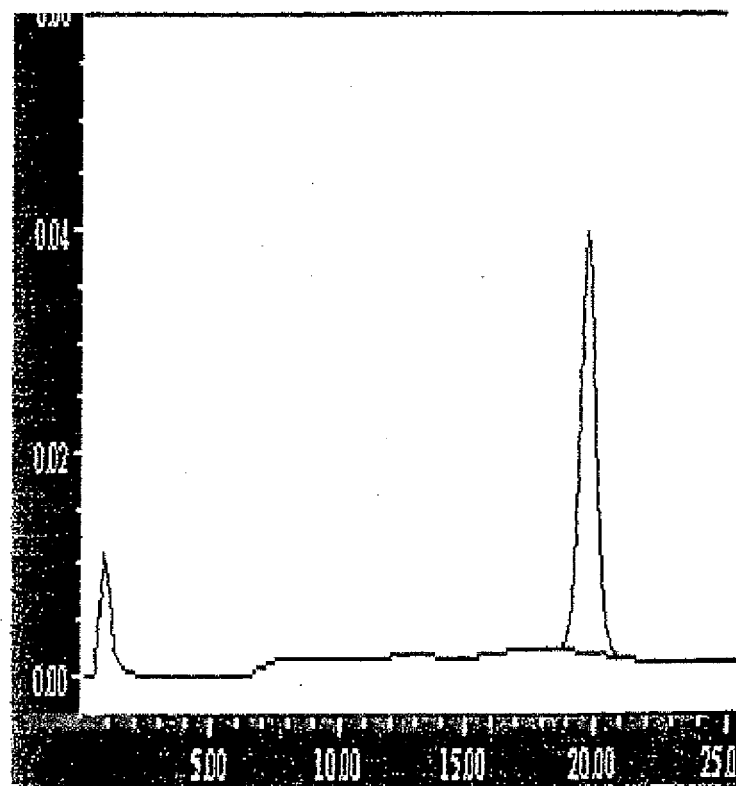


Figure 4

5/6

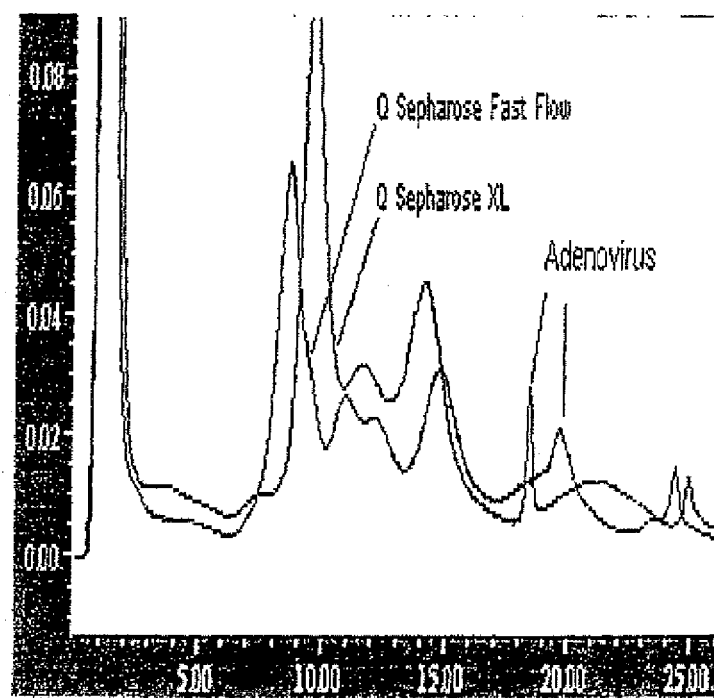


Figure 5

6/6

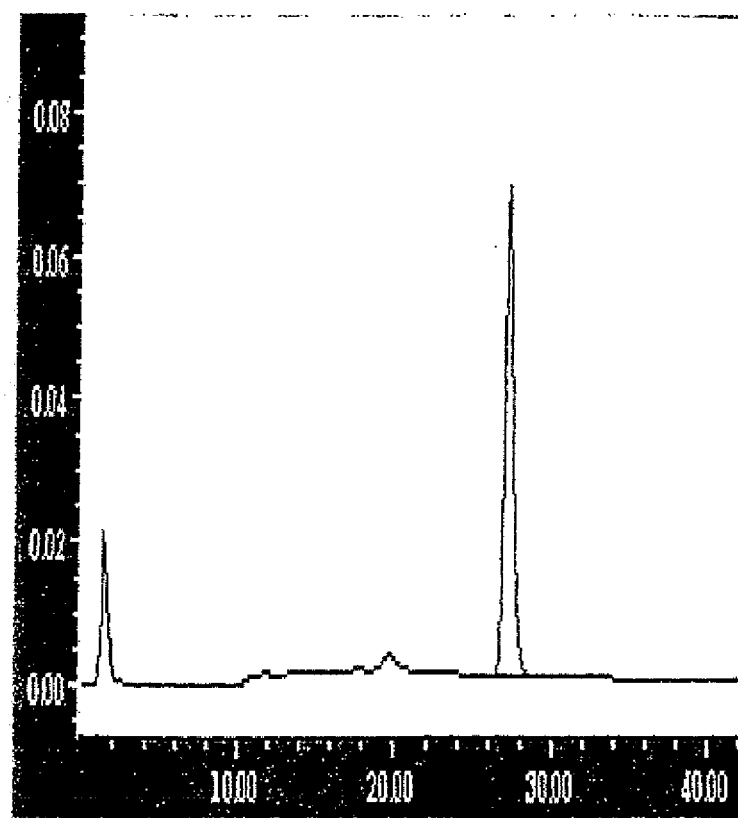


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/FR 99/03315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N7/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 00524 A (GUILLAUME JEAN MARC ;BLANCHE FRANCIS (FR); RHONE POULENC RORER SA) 8 January 1998 (1998-01-08) cited in the application page 12, line 23 -page 16, line 7 example 5 claims 1,5-10,13,19-29 --- ---	1,2,7,8, 12,13, 15-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are cited in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *S* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 February 2000		Date of mailing of the international search report 14/02/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentstrasse 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stein, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/FR 99/03315

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 22588 A (INTROGEN THERAPEUTICS INC ;CHO TOOHYON (US); ZHANG SHUYUAN (US); I) 28 May 1998 (1998-05-28) cited in the application page 3, line 14 - line 23 page 36, line 8 - line 25 page 65, line 1 - line 5 page 76, line 6 - line 14 page 77, line 8 - line 20 example 6 claims 1,2,22-30	1,2,7,8, 12,13, 16,18,19
X	WO 98 39467 A (HENERSON DANIEL R ;LAMPARSKI HENRY G (US); CALYDON INC (US); SCHUR) 11 September 1998 (1998-09-11)	1-14
Y	figure 11; example 7	20-24
Y	SHABRAM PW ET AL: "Analytical anion-exchange HPLC of recombinant Type-5 adenoviral particles" HUMAN GENE THERAPY, vol. 8, no. 4, 1 March 1997 (1997-03-01), pages 453-465, XP002119295 cited in the application the whole document en particulier p.455 colonne 2 l.18-p.456 colonne l l.11	20,21, 23,24
Y	HARUNA I ET AL: "Separation of adenovirus by chromatography on DEAE-cellulose" VIROLOGY, vol. 13, 1961, pages 263-267, XP002119296 cited in the application the whole document	22

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte. Appl. No.

PCT/FR 99/03315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9800524 A	08-01-1998	FR 2750433 A	02-01-1998
		AU 3447097 A	21-01-1998
		BR 9710030 A	10-08-1999
		CA 2258158 A	08-01-1998
		CZ 9804383 A	17-03-1999
		EP 0944717 A	29-09-1999
		NO 986202 A	15-02-1999
WO 9822588 A	28-05-1998	AU 5361798 A	10-06-1998
		EP 0968284 A	05-01-2000
		NO 992389 A	19-07-1999
WO 9839467 A	11-09-1998	AU 6187698 A	22-09-1998
		AU 6345098 A	22-09-1998
		AU 6445698 A	22-09-1998
		EP 0968298 A	05-01-2000
		WO 9839464 A	11-09-1998
		WO 9839466 A	11-09-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dep. : internationale No
PCT/FR 99/03315

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N7/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où des documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 00524 A (GUILLAUME JEAN MARC ;BLANCHE FRANCIS (FR); RHONE POULENC RORER SA) 8 janvier 1998 (1998-01-08) cité dans la demande page 12, ligne 23 -page 16, ligne 7 exemple 5 revendications 1,5-10,13,19-29 -/-	1,2,7,8, 12,13, 15-19

☒ Voir la suite du code C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tout autre moyen
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document antérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 février 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/02/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5518 Patentkan 2
NL - 2220 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 800 nt,
Fax (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Stein, A

Formulaire PCT/ISA/210 (document unique) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Gen e internationale No
PCT/FR 99/03315

C. (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WO 98 22588 A (INTROGEN THERAPEUTICS INC ;CHO TOOHYON (US); ZHANG SHUYUAN (US); T) 28 mai 1998 (1998-05-28) cité dans la demande page 3, ligne 14 - ligne 23 page 36, ligne 8 - ligne 25 page 65, ligne 1 - ligne 5 page 76, ligne 6 - ligne 14 page 77, ligne 8 - ligne 20 exemple 6 revendications 1,2,22-30</p>	<p>1,2,7,8, 12,13, 16,18,19</p>
X	<p>WO 98 39467 A (HENERSON DANIEL R ;LAMPARSKI HENRY G (US); CALYDON INC (US); SCHUJ) 11 septembre 1998 (1998-09-11) figure 11; exemple 7</p>	<p>1-14</p>
Y	<p>SHABRAM PW ET AL: "Analytical anion-exchange HPLC of recombinant Type-5 adenoviral particles" HUMAN GENE THERAPY, vol. 8, no. 4, 1 mars 1997 (1997-03-01), pages 453-465, XP002119295 cité dans la demande le document en entier en particulier p.455 colonne 2 l.18-p.456 colonne 1 l.11</p>	<p>20-24</p>
Y	<p>HARUNA I ET AL: "Separation of adenovirus by chromatography on DEAE-cellulose" VIROLOGY, vol. 13, 1961, pages 263-267, XP002119296 cité dans la demande le document en entier</p>	<p>20,21, 23,24</p>
Y	<p>HARUNA I ET AL: "Separation of adenovirus by chromatography on DEAE-cellulose" VIROLOGY, vol. 13, 1961, pages 263-267, XP002119296 cité dans la demande le document en entier</p>	<p>22</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De: le internationale No

PCT/FR 99/03315

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
WO 9800524 A	08-01-1998	FR 2750433 A	02-01-1998
		AU 3447097 A	21-01-1998